بررسی پارازیتولوژیکی و مولکولی *بابزیا میکروتی* در جوندگان شهرستان سراب (آذربایجان شرقی)

اسماعیل فلاح[۱]، ندا ابوالسلطانی[۱]، احد بازمانی[۱]، مجید خانمحمدی[۲]، تیمور حضرتیان[۱]، عباس شهبازی*[۱]

چکیده

عامل بیماری بابزیوزیس یا پیروپلاسموزیس، تک یاخته‌ای کوچک به نام بابزیا است. محدوده وسیعی از حیوانات از جمله آبزیان، دوزیستان، جوندگان، خزندگان، پرندگان، پستانداران و انسان به این انگل آلوده می‌شوند. پس یکی از مهمترین بیماری‌های عفونی انگلی مشترک بین انسان و حیوان محسوب می‌شود و به عنوان یک مشکل بهداشتی در برخی از کشورهای مناطق گرمسیر مطرح می‌باشد و از نظر اقتصادی نیز حائز اهمیت می‌باشد. عامل بابزیوزیس در ایران *بابزیا میکروتی* می‌باشد و جوندگان نیز یکی از مخازن بیماری هستند. این تحقیق اولین مطالعه به روش مولکولی برای تعیین میزبان مخزن بودن جوندگان برای *بابزیا میکروتی* در شهرستان سراب و روستاهای اطراف می‌باشد. با استفاده از تله‌های زنده گیر، تعداد ۱۰۰ جوندگان از ٤ گونه مختلف شامل *موس موس کولوس*، *مریونس پرسیکوس*، *کریستولوس میگراتوریوس* و *مزوکریستوس آئوراتوس* از روستاهای مختلف شهرستان سراب صید شدند. نمونه خون تمام جوندگان صید شده با تست‌های پارازیتولوژیکی (تهیه ایمپرسیون اسمیر از بافت طحال و تهیه گسترش نازک خون محیطی)، مورد آزمایش قرار گرفت. با تشریح و بررسی پارازیتولوژیکی تمام جوندگان صید شده از ٤ گونه مختلف، در بررسی اسمیر فشاری از بافت طحال ۳ سر *موس موس کولوس* شیزونت بابزیا مشاهده نگردید. ولی در لام گسترش نازک خون، انگل بابزیا به صورت کلابی شکل درون گلبول‌های قرمز مشاهده گردید. میزان آلودگی، ۳٪ بود. نهایتا نتایج روش‌های پارازیتولوژیکی با استفاده از روش مولکولی PCR مورد تایید نهایی قرار گرفت و گونه ایزوله شده انگل، *بابزیا میکروتی* (*Babesia microti*) تعیین گردید. در این مطالعه مشخص گردید که جوندگان به خصوص *موس موس کولوس* می‌توانند به عنوان میزبان مخزن برای بابزیوزیس در شهرستان سراب از استان آذربایجان شرقی باشند.

واژگان کلیدی: *بابزیا میکروتی*، جوندگان، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، سراب، ایران

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۲/٤/۱۳

مقدمه

شهرستان سراب از شمال به شهرستان مشکین شهر و هریس و از شرق به استان اردبیل، از جنوب به شهرستان میانه و از غرب به شهرستان بستان آباد محدود است. شهرستان سراب به واسطه قرار گرفتن ما بین دو رشته کوه بزقوش در جنوب، و ارتفاعات سبلان در شمال، دارای آب و هوایی سرد و کوهستانی است که در تابستان معتدل و در زمستان دارای آب و هوای سرد می‌باشد و یکی از نقاط سردسیر کشور به شمار می‌رود. علیرغم گسترش و فراوانی قابل توجه جوندگان در شرایط مختلف آب و هوایی و اهمیت فراوانی که این قبیل حیوانات از نظر بهداشتی دارند، در مقایسه با سایر پستانداران ایران کمتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. تاکنون بررسی‌های نسبتا وسیعی توسط محققین کشورمان بر روی انگل‌های چهارپایان اهلی (زوج سمان و فرد سمان) به عمل آمده است و در مورد آلودگی‌های انگلی گوشتخواران ایران نیز بایستی اشاره نمود که تا زمان حاضر بیش از ٤٠ بررسی و مطالعه نسبتا جامع در ایران انجام شده است (۵ و ۲، ۱). در حالیکه تعداد بررسی‌های مکتوب و منتشر شده پیرامون انگل‌های جوندگان ایران فقط ۱۲ مورد بوده است که البته اکثر آنها کاملا اختصاصی بوده و تنها انگل خاص و یا جنبه‌های ویژه انگل شناسی را مور توجه قرار داده‌اند. مطالعات مختلف نشان می‌دهند بیش از ۱۲ بیماری باکتریایی، ۱۱ بیماری ویروسی و ۱۵ بیماری انگلی از جوندگان به انسان قابل انتقال می‌باشند (٦ و ۳، ۲)، که با شناخت زیست‌شناسی، بوم‌شناسی و رابطه این عوامل با میزبانان شان قادر به کنترل بهتر این قبیل بیماری‌ها در انسان خواهیم بود. لذا بررسی روی جوندگان از دیدگاه انگل‌شناسی به دلیل جمعیت فوق‌العاده بالای آنها، پراکندگی وسیع آنها در اقلیم های مختلف آب و هوایی و ارتباط عمیق و نزدیک بسیاری از گونه‌ها با انسان و سایر حیوانات از اهمیت خاصی برخوردار است. گونه‌هایی که باعث ایجاد بیماری در جوندگان و انسان می‌شوند عبارتند از

۱*ـ مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری تبریز، تبریز، ایران (Shahbazy42@yahoo.com)
۲ـ گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی مرند، مرند، ایران

بابزیا میکروتی در جوندگان و انسان، و *بابزیا رودینی* در جوندگان (٤). *بابزیا میکروتی* یکی از تک یاختههایی است که قادر است از طریق جوندگان به انسان منتقل گردد (۲). بیشترین مـوارد گـزارش شـده این نوع بابزیا در انسان از کشورهـای آمریکایی بوده است. تاکنون حدود ۱۲۰ مورد بابزیوزیس انسانی از ایالات مختلف آمریکا گزارش شده است، که به غیر از دو مورد بقیه آنها مربوط به *بابزیا میکروتی* بوده است (۵). در اروپا نیز عفونت با *بابزیا میکروتی* رو به افزایش بوده و به عنوان یک معضل سلامتی محسوب میشود(۱۲و۱۰). حدود ۸۰ درصد موارد ابتلا در کسانی بوده است که دارای طحال سالم بوده اند. البته تظاهرات بالینی در افراد بدون طحال شدیدتر است. بعضی از این قبیل بیماران به مدت چندین هفته تا چند ماه ناقل انگل بوده اند که این وضعیت در چهار مورد منجر با ایجاد عفونتهای ناشی از انتقال خون گردیده است(٤). بررسیهای سرولوژیک نشان میدهند که اکثر بیماران مبتلا به *بابزیا میکروتی*، بدون علامت بالینی میباشند. *بابزیا میکروتی* در موشهای صحرایی و موشهای گوزنی (موش پا سفید) یافت شده است. ناقل این بابزیا کنه *ایکسودس دامینی* (*Ixodes dammini*) است. این کنه در انتقال بیماری لایم نقش اصلی را بر عهده دارد و طی مراحل لاروی، لنفی و بلوغ، خونخواری میکند. جوندگان، میزبان اصلی دو مرحله اول محسوب میشوند در حالیکه گوزنها میزبان کنههای بالغ هستند. فقط نمفها که از اول اردیبهشت تا مهرماه خونخواری میکنند قادر به انتقال *بابزیا میکروتی* هستند. از آنجایی که نمف پس از خونخواری هنوز کوچک بوده و بیش از دو میلیمتر قطر ندارد، لذا ممکن است فرد آلوده به این حشره از وجود آن بیخبر بماند. انتقال این انگل از طریق تخم ناقل انجام نمیگیرد(۵).

مواد و روش کار

با استفاده از تلههای زنده گیر،جوندگان صید شده (٤ گونه مختلف شامل موس موس کولوس، مریونس پرسیکوس، کریستولوس میگراتوریوس و مزوکریستوس آئوراتوس) (جدول ۱) به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز منتقل و با کلروفرم بیهوش گردیدند. مشخصات ظاهری، طول لاله گوش، دم، پای عقب و سر و بدن بر حسب میلیمتر ثبت گردید تا جوندگان صید شده با استفاده از کلید تشخیصی شناسایی گردند. آن گاه از خون قلب همه جوندگان صید شده گسترش نازک تهیه شد.گسترش نازک ابتدا با متانول فیکس و به وسیله گیمسا (به نسبت ۱ به ۱۰) رنگ آمیزی شد. از نمونه خون تام، استخراج DNA به عمل آمد و عملیات PCR بر روی آن با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *بابزیا میکروتی* جهت تکثیر قطعه ۵۱۷ bp جایگاه ژنی s ۱۸rRNA انجام پذیرفت و به طور کلی سیستم واکنش PCR برای ۲۰ µL طراحی شد. اجزای واکنش PCR و حجم هر یک به این ترتیب بود: ۱۰ µL بافر PCR (TBE) و مقدار ۵ I.U از آنزیم DNA Taq Polymerase و۲۰ PM از هر پرایمر (RLB-F, RLB-R) و۲۵۰ mM dNTP و ۳ mM $Mgcl_2$ و۱۰۰ ngr از DNA استخراج شد. پس از تهیه این مخلوط نمونهها را در داخل دستگاه ترمال سایکلر گذاشته و جهت در ۳۵ سیکل و درجه حرارت لازم به شرح ذیل بهینهسازی گردید.به منظور ردیابی DNA بابزیا آغازگرهای زیر مورد استفاده قرار گرفت (۹) :

RLB-F:(*5′*-GAGGTAGTGACAAGAAATAACAATA-*3′*)
RLB-R:(5′-TCTTCGATCCCCTAACTTTC- *3′*)

مرحله ۱: واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه

مرحله۲: شروع اولین چرخه با واسرشت در دمای ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ٤۰ ثانیه

مرحله۳: اتصال در در دمای ٦۰/۳ درجه سانتی گراد به مدت ٤۰ ثانیه

مرحله٤: پایان چرخه اول با تکثیر (extension) در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ٦۰ ثانیه

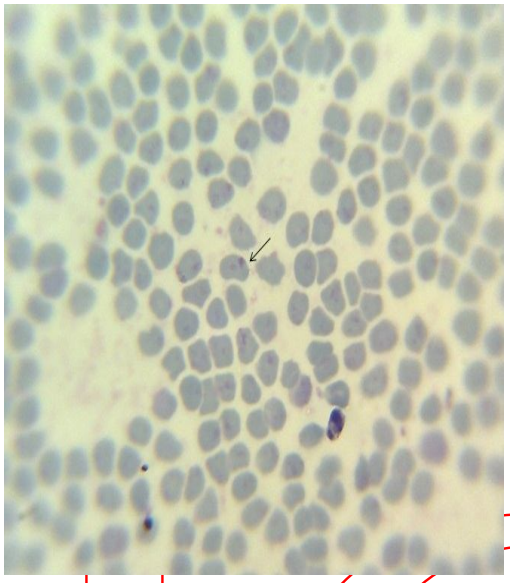
مرحله٥: تکرار چرخه (مراحل ۲و۳ و٤) به تعداد ۳۵ چرخه

مرحله٦: تکثیر نهایی (extension) در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه

سپس برای الکتروفورز نمونه‌های حاصل از PCR، از ژل ۱/۵٪ استفاده شد. برای رنگ آمیزی، رنگ سیناژن ٦میکرو در ۱۰۰ میلی لیتر (Cinnagen safe stain) مورد استفاده قرار گرفت که مشکل کارسینوژن بودن اتیدیوم بروماید را نیز رفع می‌نمود. محصولات نهایی PCR جهت تعیین مثبت یا منفی بودن از نظر بابزیا در داخل ژل، بارگذاری شد. بدین ترتیب که مقدار ۸ میکرولیتر از محصول نهایی، در چاهک‌های ژل آگارز ۱/۵٪ بارگذاری شد و در ولتاژ ۱۰۰ (۵-۱۰ Volt/cm) قرار گرفت و سپس ژل، در ژل داک قرار داده شد و در زیر اشعه UV با استفاده از دستگاه لومیناتور، از نظر وجود باندهایی با اندازه bp ۵۱۷ بررسی گردید.

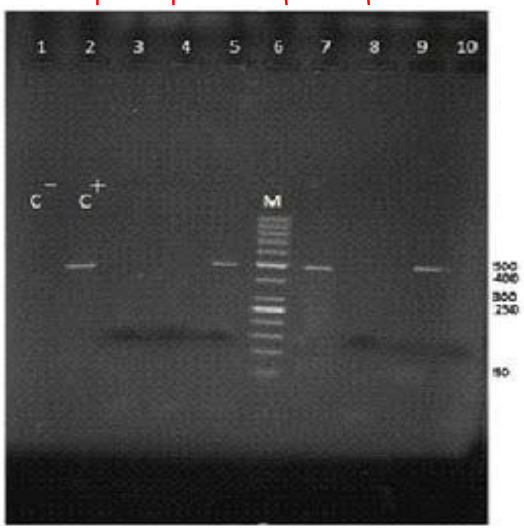
نتایج

از ۱۰۰ گسترش نازک خونی بررسی شده، در سه سر از موس موس *کولوس*ها که از روستاهای رازلیق، هریس و هولیق بودند، اشکال بابزیا به فرم گلابی شکل جفت مشاهده گردید (نگاره ۱) .



نگاره ۱- بابزیا میکروتی داخل گلبول‌های قرمز، بزرگنمایی X100

و نیز در بررسی‌های مولکولی سه جونده فوق، سه باند که مربوط به بابزیا میکروتی بود، ایجاد گردید که وزن محصول در حدود bp ۵۱۷ بود (نگاره ۲).



نگاره ۲- نتایج به دست آمده از مرحله PCR جهت تشخیص *بابزیا میکروتی*
M: DNA Ladder، شماره ۱: کنترل منفی ، شماره ۲: کنترل مثبت، شماره‌های ۵ و ۷ و ۹: باند bp ۵۱۷ نشان دهنده *بابزیا میکروتی*

جدول ۱ـ میزان آلودگی به بابزیا میکروتی و گونه‌های جوندگان صید شده در منطقه سراب

گونه‌های جوندگان	تعداد جوندگان بررسی شده	تعداد موارد مثبت (درصد)
موس موس کولوس Musmusculus (موش خانگی)	٥٤	٣(٥/٥)
مریونس پرسیکوس Meriones Persicus (ژربیل ایرانی)	٣٨	-
کریستولوس میگراتوریوس Cricetulus Migratorius (هامستر خاکستری)	٧	-
مزوکریستوس آئوراتوس Mesocricetus Auratus (هامستر طلایی)	١	-
جمع	١٠٠	(٣)٣

بحث

علیرغم گسترش و فراوانی قابل توجه جوندگان در اقلیم‌های مختلف آب و هوایی ایران و اهمیت فراوان این قبیل حیوانات از نظر بهداشتی در ایران، فقط یک مورد مطالعه آن هم صرفا با روش پارازیتولوژیک پیرامون انگل *بابزیا میکروتی* در جوندگان وجود دارد که توسط محبعلی و همکاران در شهرستان مشکین شهر از استان اردبیل انجام گرفته است(٥). همچنین در سایر کشورها نیز در این زمینه مطالعات اندکی وجود دارد. مواردی از بابزیوزیس انسانی با روش تهیه گسترش خونی در تایلند و ژاپن گزارش شده است. در تایلند، Dantrakool و همکاران پیروپلاسم‌ها را در موش‌های *بندیکتا ایندیکا* (*Bandicota inindica*) و در سال ١٩٦٤ در موش‌های خاردار *راتوس کوکسینگا* (*Rattus coxinga*) شناسایی نمودند و اولین بیمار تایلندی در سال ١٩٩٧ گزارش شده بود(٨). در تحقیقاتی که بر روی موش‌های راه راه (*Apodemus agrarius*) از نظر وجود انگل‌های خونی و ویژگی‌های آنها در شرق اسلوواکی توسط Karbowiak و همکاران در طی سال‌های ٢٠٠٥ – ١٩٩٨ در ماه‌های مارس تا نوامبر با استفاده از تهیه گسترش‌های خونی صورت گرفت، عفونت بابزیا و پیرو پلاسما فقط در ٢ منطقه یافت شده و شدت عفونت بیشتر از ٠/١٪ نبوده است. در اریتروسیت‌های آلوده، انگل به صورت تکی و به اشکال حلقوی و گلابی شکل دیده شد و مروزوئیت ها کوچکتر و نا منظم بودند و اشکال منظم چهار تایی برای گونه‌های کوچک بابزیا که اصطلاحا مالتس ـ کراس نامیده می‌شود، تثبیت نشده بود(١١). در بررسی‌های سرولوژیک و مولکولی که در ترکیه بر روی سنجابهای درختی (*Spermophilus Xanthophrymnus*) در قسمت‌های آناتولی انجام گرفته بود، وجود *بابزیا میکروتی* به اثبات رسیده است و نیز در یک مطالعه انجام گرفته در ترکیه توسط Poyraz و همکاران در ماههای می تا ژوئن ٢٠٠٧ – ٢٠٠٦، نمونه‌های خون ٢٧٣ نفر از مردم روستا نشین منطقه سینوپ جمع آوری گردیده و آنتی بادی IgG ضد *بابزیا میکروتی* با استفاده از روش سرولوژیک IFA مورد آزمایش قرار گرفته بود که ٦/٢٣٪ از این نمونه‌ها از نظر وجود آنتی بادی در سرم مثبت بودند(١٤). در طی مطالعه‌ای که در لهستان توسط Sinski و همکاران بطور همزمان بر روی کنه های *ایکسودس رسینوس* و جوندگان وحشی با استفاده از روش‌های تهیه گسترش خونی و رنگ آمیزی گیمسا و نیز روش‌های مولکولی (Nested-PCR) انجام گرفته بود، وجود *بابزیا میکروتی* در هم کنه ها و هم جوندگان وحشی به اثبات رسیده است (١٥). در ژاپن طی مطالعه انجام گرفته توسط Okabayashi و همکاران بر روی نمونه‌های خون ٩٧ موش به دام انداخته شده در هوکایدو ژاپن، با استفاده از کاغذهای جاذب (Filter Papers) خون و روش مولکولی Nested – PCR، وجود *بابزیا میکروتی* به ثبت رسیده است(١٣). همچنین در یک بررسی انجام شده در کرووواسی توسط Beck و همکاران، جهت اثبات وجود بابزیا میکروتی در جوندگان وحشی، ١٢٠ جونده جمع آوری شده بود که با استفاده از تکنیک *PCR*، ٢ گونه از جوندگان وحشی شامل *A. flavicollis* و *M. glareolus*، به *بابزیا میکروتی* آلوده بودند در

حالیکه ۲ گونه دیگر، *Apodemus sylvaticus* و *Apodemus agararius* عاری از انگل بودند (۷). در طی مطالعه انجام گرفته توسط محبعلی و همکاران بر روی جوندگان شهرستان مشکین شهر در استان اردبیل، از شهریور ماه ۱۳۷۳ تا آبان ماه ۱۳۷٤، مجموعا ۱۳۲ جونده از چهار جنس مختلف شامل *مریونس پرسیکوس*، *کریستولوس میگراتوس*، *موس موس کولوس* و *آلاکتا گا الاتر*، از مناطق مختلف این شهرستان بطور زنده صید و از نظر انگل‌های داخل و خارج سلولی مورد مطالعه قرارگرفته بودند، که در گسترش نازک تهیه شده از خون قلب یکی از *مریونس پرسیکوس*‌های صید شده، انگل *بابزیا میکروتی* به اشکال دوتایی با انتهای بر آمده به ابعاد ۲×۱/۵ میکرون، و اشکال رینگ فرم دیده شده بود(۵). اصول و پایه در این مطالعه به روش‌های ریخت شناسی و عمدتا با استفاده از روش‌های مولکولی بوده است که نتایج حاصل از PCR، مشاهدات میکروسکوپی را تایید نمود، با توجه به نتایج حاصله و مقایسه آن با سایر مطالعات، آلودگی *موس موس کولوس* به *بابزیا میکروتی* در این منطقه نیز محرز گردید و نقش جوندگان به عنوان یکی از مخازن بیماری در منطقه را خاطرنشان کرد. با توجه به اینکه این نوع بابزیا به انسان قابل انتقال است و از نظر بهداشتی حائز اهمیت می‌باشد، می‌بایست اقدامات کنترلی برای کاهش جمعیت جوندگان و مبارزه با کنه‌های ناقل صورت گیرد. پیشنهاد می‌شود که بررسی‌های جامع‌تر و کامل‌تری پیرامون میزان آلودگی جوندگان و سایر حیوانات در مناطق مختلف کشور از نظر نوع ناقلین و راه‌های انتقال انگل و جستجوی میزان آلودگی انسان صورت گیرد.

تشکر و سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی تبریز و بعنوان طرح شماره ۹۰-۱۰٤۹۵ آن مرکز اجرا گردیده است. «این مقاله منتج از پایان‌نامه مقطع کارشناسی‌ارشد خانم ندا ابوالسلطانی با شماره پایان‌نامه ۲/۲-۹۰/۲ می‌باشد».

فهرست منابع

۱- اسفندیاری، ع.(۱۳٦٤) تک یاخته‌های بیماریزای انسان و روش‌های تشخیص آزمایشگاهی.انتشارات جهاد دانشگاهی تهران.: ۱٤۲-۱۱۵,

۲- توسلی، م. (۱۳۸۵): تک یاخته شناسی دام پزشکی،انتشارات جهاد دانشگاهی واحد استان آذربایجان غربی، ۱۲۹-٤۹.

۳-راک، ه. (۱۳۵۲): بعضی از کرم‌ها و بندپایان انگلی موش خانگی،نامه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۲۹-، شماره ۱٤: ۲۵-۲۰.

٤- محبعلی، م. (۱۳۷۵) : بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان، نشر نادی: ۱٦۰-۱۵٤

۵- محبعلی، م.(۱۳۷٦): گزارش اولیه *بابزیا میکروتی* *Babesia microti*در جوندگان صید شده از شهرستان مشکین شهر، استان اردبیل، ایران. مجله بهداشت ایران، سال بیست و ششم، شماره ٤-۳: ۱۸-۲٤.

٦- ندیم، الف. (۱۳٤٤): جوندگان، روش‌های مطالعه بیماری‌های منتقله و طرق مبارزه، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، نشریه شماره ۱۵٤۳: ۱۰۵-۱۸.

7- Beck, R., Vojta, L., Curkovic, S., Mrljak, V., Margaletic, J., Habrun, B. (2011): Malecular Survey of Babesia microti in Wild Rodents in Central Croatia: Vector – Borne and Zoonotic Diseases. 11(1): 81-3.

8- Dantrakool, A., Somboon, P., hashimato, T., Ito, A. (2004): Identification of a New Type of Babesia Species in Wild Rats (Bondicota indica) in Ching Mai Province, Thailand: Journal of Clinical Microbiology. 42(2):850-4.

9- Gubbles, J.M., Dee Vos, A.P.,Van Der Weild , M., Viseras, J., Schouls, L.M., Vries, E.D., Jongejan, F. (1999): Simultaneous Detection of Bovine Theileria and Babesia Species by Reverse Line Blot Hybridization: Journal of Clinical Microbiology. 37(6):1782-9.

10- Hildebrandt, A., Hunfeld, K.P., Baier, M., Krumbholz, A., Sachse, S., Lorenzen, T., Kiehntopf, M., Fricke, H.J., Straube, E. (2007):

First confirmed autochthonous case of human Babesia microti infection in Europe: European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 26(8):595-01.

11- Karbowiak, G., Stanko, M., Fricova,I., Wita, I., Hapunik, J.,Petko, B. (2009): Blood Parasites of the Striped Field Mouse Apodemus agrarius and Their Morphological Characteristics: Biologia. 64(6): 1219-24.

12- Mitrović, S., Kranjcić - Zec, I., Arsić Arsenijević, V., Dzamić, A., Radonjić, I. (2004): Human babesiosis – recent discoveries: Med Pregl. 57: 349-53.

13- Okabayashi, T., Hagya, J., Tsuji, M., Ishihara, C., Toh, H.S., Morita, C. (2002): Detection of Babesia microti like parasite in Filter paper – Absorbed Blood of Wild Rodent. The Journal of Veterinary Medical Science. 64(2):145-7.

14- Poyraz, O., Gunes, T. (2010): yoresinde kirsal kesimde yasayan insanlarda babesia microti seroprevalansi: Turkiye Parazitoloji Dergesi. 34 (2): 81-5.

15- Sinski, E., Banjer, A., Welc, R., Pawelczyk, A., Ograzewalska, M., Behneke, J .M. (2006): Babesia microti: Prevalence in Wild Rodents and Ixodes ricinus Ticks from the Mazrary Lakes District of North – Eastern Poland.: International Journal of Medical Microbiology. 296: 137-43.

JCP